

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**STANOVENÍ POMĚRU PLOCHY TUBULÁRNÍ A
POVRCHOVÉ MEMBRÁNY U KARDIOMYOCYTŮ**

DETERMINATION OF THE AREA RATIO OF TUBULAR AND SURFACE MEMBRANES IN
CARDIOMYOCYTES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Hluší

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Larisa Chmelíková

BRNO 2021

Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Veronika Hluší

ID: 210456

Ročník: 3

Akademický rok: 2020/21

NÁZEV TÉMATU:

Stanovení poměru plochy tubulární a povrchové membrány u kardiomyocytů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši a seznámte se s vlastnostmi a významem tubulárního systému u srdečních buněk. 2) Nastudujte techniky fluorescenční a konfokální mikroskopie a zvolte vhodnou techniku pro snímání tubulárního systému kardiomyocytů. 3) Prakticky zrealizujte snímání tubulárního systému kardiomyocytů s použitím vybrané mikroskopické techniky. 4) Navrhněte vhodný způsob barvení kardiomyocytů pro odlišení plochy tubulární a povrchové membrány. Navrhněte a v libovolném programovém prostředí realizujte vhodnou metodu pro segmentaci membrány a tubulárního systému srdečních buněk. 5) Získaná data segmentujte navrženou metodou a vypočítejte poměr plochy tubulární a povrchové membrány. 6) Dosažené výsledky vyhodnoťte a závěry diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] HONG, TingTing a Robin M. SHAW. Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. Physiological Reviews. 2017, 97(1), 227-252. ISSN 0031-9333.

[2] DIBB, Katharine M., Jessica D. CLARKE, Margaux A. HORN, Mark A. RICHARDS, Helen K. GRAHAM, David A. EISNER a Andrew W. TRAFFORD. Characterization of an Extensive Transverse Tubular Network in Sheep Atrial Myocytes and its Depletion in Heart Failure. Circulation: Heart Failure. 2009, 2(5), 482-489. ISSN 1941-3289.

Termín zadání: 8.2.2021

Termín odevzdání: 28.5.2021

Vedoucí práce: Larisa Chmelíková

doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato práce obsahuje literární rešerši ohledně funkce a struktury tubulárního systému kardiomyocytů. Další teorie zahrnuje základní princip fluorescence a popis fluorescenčního a konfokálního mikroskopu. Dále je zde popsán princip izolace a následného barvení kardiomyocytů pro získání snímků tubulárního systému. Následuje realizace metody pro segmentaci membrány a tubulárního systému buněk srdečních buněk a aplikace této metody na získaná data.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kardiomyocyt, tubulární systém, fluorescence, fluorescenční mikroskopie, konfokální mikroskopie

ABSTRACT

This work contains a literature search regarding the function and structure of the tubular system of cardiomyocytes. Another theory includes the basic principle of fluorescence and a description of the fluorescence and confocal microscope. Next chapter describe the principle of isolation and subsequent staining of cardiomyocytes to obtain images of the tubular system is described. Next step is the implementation of a method for segmentation of the membrane and tubular system of cardiac cells and the application of this method to the obtained data.

KEYWORDS

Cardiomyocyte, tubular network, fluorescence, fluorescence microscopy, confocal microscopy

HLUŠÍ, Veronika. *Stanovení poměru plochy tubulární a povrchové membrány u kardiomyocytů*. Brno, 2021, 39 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce: Larisa Chmelíková ,

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma „Stanovení poměru plochy tubulární a povrchové membrány u kardiomyocytů“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autorky

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Larise Chmelíkové za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

Obsah

Úvod	8
1 Tubulární systém srdečních buněk	9
1.1 Struktura	9
1.2 Funkce	10
1.3 Životní cyklus	10
2 Fluorescenční mikroskop	11
2.1 Fluorescence	11
2.2 Fluorescenční barviva	12
2.2.1 Fluorescenční barviva ANEP	13
2.2.2 Fluorescenční barvivo CMFDA	14
2.2.3 Fluorescenční barvivo Fluo-8	15
2.3 Konstrukce fluorescenčního mikroskopu	16
2.4 Výhody a nevýhody	18
3 Konfokální mikroskop	19
3.1 Princip	19
3.2 Laserový rastrovací konfokální mikroskop LEICA TCS SP8	20
3.3 Výhody a nevýhody	21
3.4 Rozdíly mezi konfokálním a fluorescenčním mikroskopem	21
4 Příprava buněk pro snímání tubulárního systému kardiomyocytů	24
4.1 Izolace kardiomyocytů	24
4.2 Barvení kardiomyocytů pomocí Fluo-8	26
4.3 Barvení kardiomyocytů pomocí di-4-ANEPPS	27
4.4 Barvení kardiomyocytů pomocí CMFDA	28
5 Program pro analýzu snímků	29
6 Hodnocení výsledků a diskuze	32
Závěr	36
Literatura	37
Seznam symbolů, veličin a zkratk	39

Seznam obrázků

1.1	Svalová buňka s t-tubuly. [2]	9
2.1	Princip fluorescence. [7]	11
2.2	Stokesův posun. [9]	12
2.3	Chemická struktura barviva Di-4-ANEPPS. [10]	14
2.4	Chemická struktura barviva CMFDA. [13]	15
2.5	Chemická struktura barviva Fluo-8. [14]	16
2.6	Konstrukce fluorescenčního mikroskopu. [7]	17
3.1	Schéma konfokálního mikroskopu. [16]	19
3.2	Snímek z fluorescenčního a konfokálního mikroskopu. [16]	22
3.3	Fluorescenční a konfokální mikroskop. [18]	22
4.1	Schéma perfuzního systému pro izolaci kardiomyocytů [20]	25
4.2	Čerstvě izolované kardiomyocyty [21]	26
4.3	Kardiomyocyt obarvený barvivem Fluo-8.	27
4.4	Kardiomyocyt obarvený barvivem di-4-ANEPPS.	27
4.5	Kardiomyocyt obarvený barvivem CMFDA.	28
5.1	Postup při zpracování nasnímaných obrazů.	29
5.2	Maska intracelulárního prostoru.	30
5.3	Maska povrchové membrány.	30
6.1	Snímek nevhodný pro další zpracování.	33
6.2	Segmentace membrány a tubulárního systému s daty cm1 a cm2.	34
6.3	Segmentace membrány a tubulárního systému s daty cm3 a cm4.	34

Úvod

Srdce je důležitý orgán, který pracuje neustále a díky němu dochází k přenosu dýchacích plynů a živin po těle. Tento orgán je tvořen pouze jedním typem buněk, a to jsou kardiomyocyty. Tubulární systém kardiomyocytů je jejich důležitou součástí, protože zajišťuje rychlou a dostatečně silnou kontrakci srdečních buněk.

Bakalářská práce je zaměřena na tubulární systém kardiomyocytů, mikroskopické metody, které dokážou tento systém nasnímat a následné zpracování získaných dat. V úvodní části práce bude provedena rešerše pro seznámení se s vlastnostmi a významem tubulárního systému u srdečních buněk.

Následující část se bude zabývat popisem fluorescenčních a konfokálních mikroskopických technik. Hodnocením jejich výhod a nevýhod, porovnáním těchto technik mezi sebou, abychom mohli zvolit tu nejvhodnější mikroskopickou techniku pro následné snímání tubulárního systému srdečních buněk.

Před samotným snímáním kardiomyocytů musí proběhnout extrakce těchto buněk. Následně musíme zvolit vhodný postup pro následné zpracování buněk, abychom je mohli pomocí zvolené mikroskopické techniky snímat.

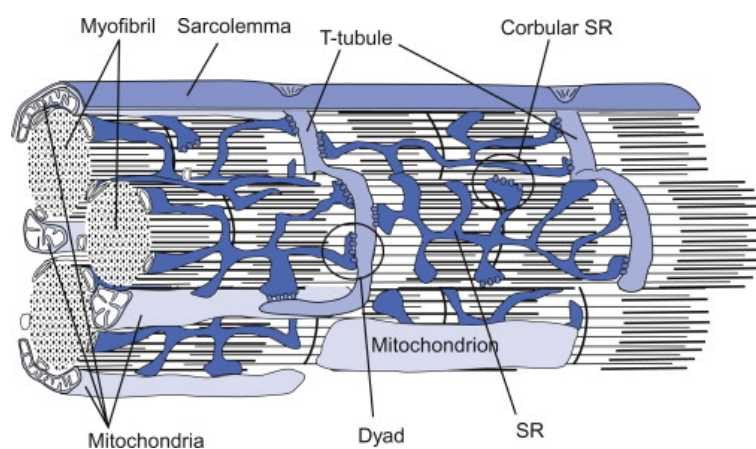
V programové části bude navržena a realizována metoda pro segmentaci membrány a tubulárního systému srdečních buněk. Tuto metodu následně použijeme na naměřená data a pomocí ní dojde k výpočtu poměru plochy tubulární a povrchové membrány. Cílem této práce je dosažené výsledky vyhodnotit a diskutovat.

1 Tubulární systém srdečních buněk

Srdeční transversální tubuly, neboli t-tubuly, jsou vysoce rozvětvené invaginace srdeční sarkolemy, ve kterých se hojně nachází iontové kanály. Tyto kanály jsou důležité pro vztah excitace a kontrakce, zahájení a regulaci akčního potenciálu, udržování klidového membránového potenciálu a signální transdukci. Společně jsou t-tubuly efektivní orgány, které slouží jako centralizovaný signalizační uzel, který kontroluje srdeční kontraktilní funkci a elektrofyziologii.[1]

1.1 Struktura

Tubulární systém srdečních buněk je tvořen fosfolipidovou dvojitou vrstvou, která je součástí i povrchové membrány nebo sarkolemy kosterní a srdeční buňky. T-tubuly jsou spojeny přímo se sarkolemou a vytvářejí síť tubulů, která probíhá příčně i rovnoběžně se sarkolemou. Díky své komplexní orientaci se t-tubuly označují také jako transversálně-axiální tubulární systém. Na povrchu buňky je vnitřek t-tubulu otevřen, a proto je naplněn tekutinou, která se nachází v extracelulárním prostoru. Membrána tvořící t-tubuly je vysoce aktivní a obsahuje proteiny zahrnující vápníkové kanály typu L, vápníkové ATPázy a beta adrenoreceptory.[1]



Obr. 1.1: Svalová buňka s t-tubuly. [2]

T-tubuly jsou přítomny jak v komorových, tak i v síňových srdečních buňkách. Tubulární systém srdečních buněk se vyskytuje v komorových srdečních buňkách většiny živočichů a v síňových srdečních buňkách větších savců. T-tubuly srdečních buněk mají průměr mezi 20 až 420nm a nacházejí se v oblastech Z-disků, kde kotví aktinová vlákna. Jako terminální cisterny jsou označovány místa, kde dochází ke spojení sarkoplazmatického retikula a srdečních t-tubulů.[1, 2]

1.2 Funkce

T-tubuly hrají důležitou roli při elektrické excitaci buňky a u její následné kontrakci. Při průchodu akčního potenciálu t-tubuly dochází k aktivaci vápníkových kanálů typu L. Aktivací tohoto kanálu může vápník přecházet do buňky. Tento vápník dokáže aktivovat ryanodinův receptor. Jeho aktivace způsobí kontrakci svalové buňky díky uvolnění vápníku do sarkoplazmatického retikula. Dalším významem t-tubulů je jejich synchronizace uvolňování vápníku v buňce. Díky rychlému šíření akčního potenciálu po t-tubulech dochází k aktivaci vápníkových kanálů typu L téměř současně. Díky této synchronizaci může docházet k silnějším kontrakcím svalových buněk. V buňkách, které nemají t-tubuly, jako mohou být nemocné kardiomyocyty, musí vápník postupně přistupovat do celé buňky. Tento proces je mnohem pomalejší a vede ke slabší kontrakci.[3]

Díky tomu, že je vnitřní prostor t-tubulů propojen s extracelulárním prostorem, budou koncentrace roztoků v těchto částech skoro totožné. Pro funkčnost t-tubulů je velmi důležitá přítomnost vápenatých iontů. V t-tubulech může docházet k zachycení iontů díky tomu, že jsou tenké. Proto mají t-tubuly dostatek vápníku, což je důležité pro umožnění svalové kontrakce. Proto zůstává koncentrace vápníku v t-tubulech relativně konstantní. T-tubuly také umožňují odstranění vápníku.[3]

1.3 Životní cyklus

Přestože jsou t-tubuly strukturně složitější jejich životnost je nestálá. T-tubuly nejsou přítomny v embryonálních myocytech, ale začínou se vyvíjet až po narození. Tento proces můžeme zpomalit, pokud stabilizujeme aktin. Při srdeční hypertrofii nebo selhání srdce se mohou t-tubuly přetvořit. Toto přetvoření, ale nemusí být konečné může docházet k postupnému zotavování t-tubulů, které probíhá společně s funkčním zotavováním srdce.[1]

Některé z částí t-tubulů jako jsou transmembránové iontové kanály a receptory jsou velice dynamické. Pomocí regulace přenosu proteinů jsou kardiomyocyty schopny udržovat stály stav iontů a molekul pro správnou homeostázu. Mezitím intracelulární cytoskeletální komponenty jako jsou kortikální aktin, mikrotubuly a kostamery jsou aktivně regulovány, aby udržovaly integritu membrány a funkci proteinů. Díky této flexibilní funkci t-tubulů se buňky zvládnou přizpůsobit zdravému i stresovému prostředí.[1]

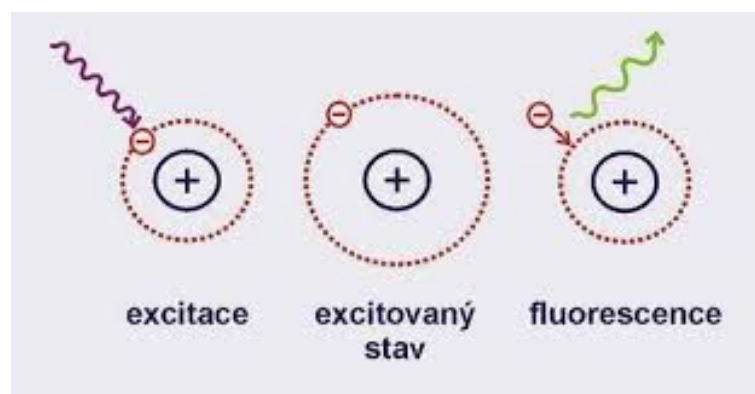
2 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop je světelný mikroskop, který nám umožňuje pozorovat a detekovat fosforeskující látky ve vzorku. V dnešní době se využívá zejména v rostlinné a živočišné histologii a buněčné biologii. Základním principem fluorescenční mikroskopie je schopnost fluorescence a fosforescence některých látek.[5]

Fluorescenční mikroskop vznikl z UV mikroskopu. Jeho vynálezci jsou Otto Heimstaedt a Heinrich Lehman. Používal se pro zkoumání prvoků, bakterií, živočišných tkání a dalších vzorků, které vykazovali autofluorescenci. Právě limitace v pozorování vzorků vedla k vývoji fluorescenčních barviv. Dichromatický dělič paprsků byl další zásadní krok ve fluorescenční mikroskopii. Tento dělič umožnil osvětlení vzorku excitačním světlem zvolené vlnové délky.[5]

2.1 Fluorescence

Atomy se s největší pravděpodobností nachází v základním energetickém stavu, který se vyznačuje minimální hodnotou energie. Pokud má atom alespoň jeden elektron ve vyšší energetické hladině je atom v excitovaném stavu. Excitovaného stavu dosáhne atom po absorbování dostatečného množství energie. Tento stav je ovšem přechodný, protože je pro atom energeticky nevýhodný. Proto dochází k přechodu atomu na nižší energetickou hladinu a zároveň ke ztrátě energie.[6]



Obr. 2.1: Princip fluorescence. [7]

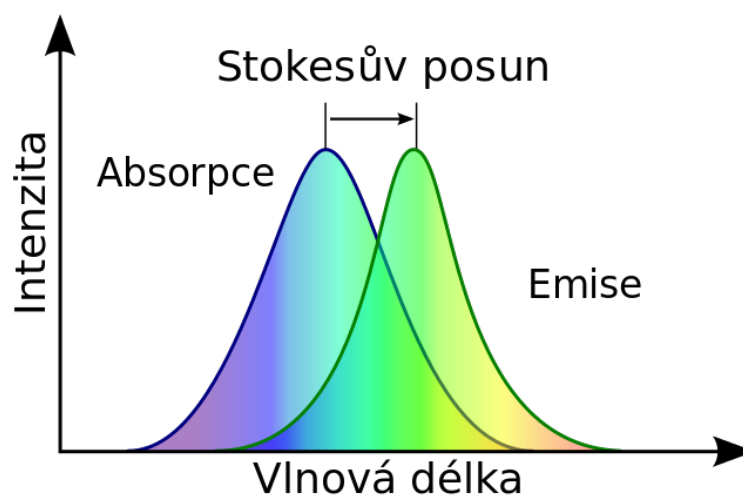
Pro fluorescenci jsou významné látky, které jsou po ozáření excitačním světlem schopny vyzařovat viditelné světlo. Důležitou podmínkou je, že vyzářené světlo musí mít delší vlnovou délku než světlo použité pro excitaci. Fluorescence je dále charakteristická rychlým vyzářením světla po excitaci látky. Protože se většina látek nevyznačuje přirozenou fluorescencí používají se ve fluorescenční mikroskopii

fluorochromy neboli fluorescenční barviva či fluorofory. V poslední době se ve fluorescenční mikroskopii stále více používají fluorochromy, protože vyzařují silnější a specifické záření.[6]

2.2 Fluorescenční barviva

Mezi látky, které vykazují autofluorescenci patří zejména aromatické sloučeniny (např.: heterocykly a polyaromatické sloučeniny) nebo aminokyseliny. Fluorescenční barviva jsou používána především pro zobrazení struktury vzorků, které nemají schopnost fluorescence. Barviva se musí být schopná vázat s danými buněčnými částmi. Existuje mnoho druhů fluorochromů, které vykazují různé vlastnosti a funkce. Díky těmto vlastnostem si můžeme vybrat konkrétní fluorofory, které jsou vhodné pro naše konkrétní měření.[8]

Mezi vlastnosti fluoroforů patří excitační a emisní pásmo, maximální vlnové délky a doba životnosti. Excitační pásmo vyjadřuje rozsah vlnových délek, které způsobí excitaci dané látky. Emisní pásmo vyjadřuje rozsah vlnových délek, u kterých dojde k fluorescenční emisi. Pokud od sebe odečteme hodnoty excitační vlnové délky a emisní vlnové délky dostaneme hodnotu pro Stokesův posun.



Obr. 2.2: Stokesův posun. [9]

Excitační i emisní pásmo mají svoje maximální hodnoty. Pokud vzorek s fluorochromem ozáříme světlem, jehož vlnová délka je stejná jako maximum excitačního pásma dojde k maximální intenzitě fluorescence. Fluorescence bude snížena, pokud použijeme jinou vlnovou délku z excitačního pásma. Pokud vzorek s fluorochromem ozáříme světlem mimo excitační pásmo k fluorescenci nedojde.[8]

Fluorochromy dělíme na dvě skupiny podle způsobu vazby. Pokud se fluorochrom do systému naváže kovalentně označuje se jako fluorescenční značka. Při nekovalentním navázání se fluorochrom označuje jako fluorescenční sonda.[8]

Fluorescenční značky se mohou vázat pomocí kovalentní vazby například s molekulami peptidů, proteinu a oligonukleotidů. Využívají se například v histochemii, imunologii nebo afinitní chromatografii. Nepoužívanějšími fluorescenčními značkami jsou fluorescein-5-isothiokyanát (FITC) a tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát (TRITC). FITC je zelené barvivo, zatímco TRITC je barvivo červené. Nově se také začali používat fluorofory nazývané BODIPY, které obsahují bór. Jejich největší předností je nezávislost na pH a polaritě.[8]

Fluorescenční sondy se váží nekovalentně například na nukleovou kyselinu, buněčnou stěnu nebo buněčnou membránu. Při jejich navázání může docházet ke změnám jejich fluorescenčních vlastností. Tyto sondy se nejčastěji používají pro zkoumání tloušťky membrán, membránového potenciálu a změn konformace bílkovin. Mezi používané fluorescenční sondy patří DAPI, ethium bromid nebo akridinová oranž. Nejvýznamnější jsou DAPI (4',6-Diamidino-2-fenylindol) a akridinová oranž, která se dokáže navázat na různé úseky DNA a podle místa navázání se liší její absorpční a emisní pásma.[8]

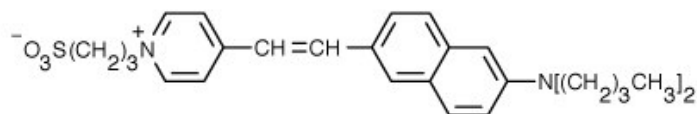
Díky nároku na delší životnost fluoroforů došlo k vývoji k tzv. luminoforů. Jsou to povětšinou anorganické látky, mezi které patří polovodičové nanočástice nebo lantanidy. Polovodičové nanočástice mají nejčastěji obsažen kadmium selenid jako hlavní komponent. Hlavní částice bývá označována jako jádro. Jádro je uloženo v obalu, který je v případě kadmium selenidu tvořen sulfidem zinečnatým. Velikost polovodičových nanočástic určuje rozsah vlnových délek.[8]

2.2.1 Fluorescenční barviva ANEP

Di-4-ANEPPS patří do skupiny barviv ANEP (Aminonaphthylethylenylpyridinium), které byly vyvinuty Leslie Loewem. Tyto barviva se používají jako sondy pro měření elektrického potenciálu u biomembrán. Vyznačují se svou rychlou odezvou na změnu elektrického potenciálu. Samostatné barviva patřící do skupiny ANEP v podstatě nevykazují žádnou fluorescenci. Až po navázání na příslušné látky se projeví jejich fluorescenční vlastnosti. Proto jsou spektrální vlastnosti těchto barviv závislé na molekule, na kterou jsou navázány. Excitační vlnové délky barviv se pohybují v rozsahu od 450 do 510nm. Pro detekci emisní fluorescence se používají hodnoty vyšší než 570nm, ale zároveň nižší než 780nm. Hodnota maxima emisního spektra je v rozsahu 708-716 nm. [10]

Vykazují také posun svých excitačních spektrů v závislosti na změně potenciálu, čehož se využívá při kvantifikaci membránového potenciálu pomocí měření

excitačního poměru. Fluorescence těchto barviv není citlivá na pH a obecně můžeme říct, že jejich fotostabilita je poměrně vysoká.[10]



Obr. 2.3: Chemická struktura barviva Di-4-ANEPPS. [10]

Barvivo di-4-ANEPPS se skládá ze tří hlavních částí, kterými jsou hydrofilní část, díky které je barvivo schopné se navázat na vnější stranu buněčné membrány. Další částí je hydrofobní část, díky níž je umožněno navázání barviva na vnitřní stranu membrány. Poslední částí je chromoforní část, která tvoří tělo barviva. Molekula barviva se naváže paralelně napříč membránou díky hydrofilním a hydrofobním částem barviva. Při excitaci barviva pomocí záření dochází v chromoforní části k velkému posunu kladného náboje. Pohyb tohoto kladného náboje je paralelní s potenciálem membrány.[10]

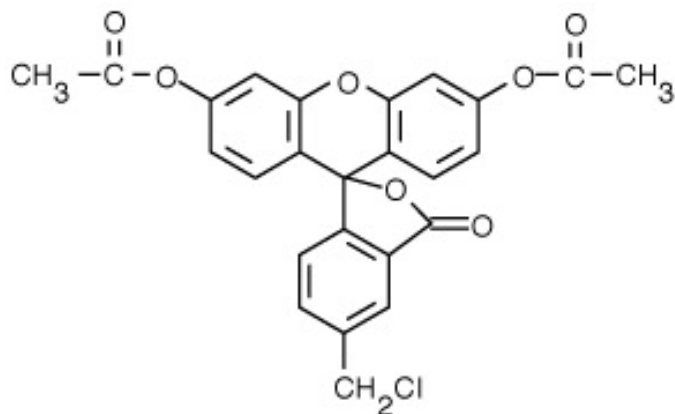
Di-4-ANEPPS je buňkou rychle interpolizováno, proto je používáno hlavně pro krátkodobé experimenty. Negativními vlastnostmi tohoto barviva je fytotoxicita, která se projevuje při zvýšené intenzitě světla a toxicita tohoto barviva při jeho vysoké koncentraci v buňce.[10]

Barvivo Di-8-ANEPPS má oproti Di-4-ANEPPS nižší fototoxicitu je fotostabilnější. Díky tomu že barvivo Di-8-ANEPPS obsahuje více lipidů je lépe absorbováno membránou buňky a díky tomu je vhodnější pro delší měření membránového potenciálu.[11]

2.2.2 Fluorescenční barvivo CMFDA

Fluorescenční barvivo CMFDA (5-chlormethylfluorescein diacetát) se řadí mezi dlouhodobě působící barviva, které se používá pro sledování buněk. Vyznačuje se zeleným emisním a excitačním spektrem. Díky jeho jasné a stabilní fluorescenci poskytuje ostrý kontrast mezi buňkou a médiem. Používá se zejména pro monitorování pohybu buněk nebo určení jejich polohy. Toto barvivo je také vhodné pro vícegenerační sledování pohybu buněk, protože po obarvení buňky je v ní barvivo velice dobře zadrženo.[12]

Barvivo CMFDA prochází přes buněčnou membránu do buňky, kde dochází k jeho aktivaci díky intracelulárním enzymům. Za účelem značení buněk spolu reaguje chlormethylová skupina barviva a proteiny které obsahují thiol. Po obarvení vykazují



Obr. 2.4: Chemická struktura barviva CMFDA. [13]

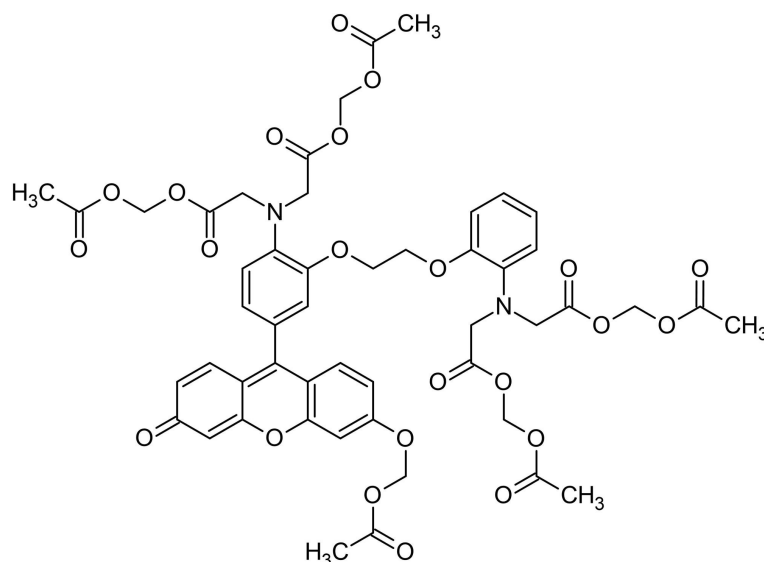
buňky fluorescenci minimálně 72 hodin. CMFDA je při doporučených pracovních koncentracích netoxické, dobře zadržované buňkou, stabilní a při fyziologickém pH jasně fluoreskuje.[13]

2.2.3 Fluorescenční barvivo Fluo-8

Existuje několik verzí barviv typu Fluo, které se od sebe odlišují svými vlastnostmi jako je citlivost na vápníkové ionty a jejich cytotoxicita. Jednotlivé verze tohoto typu barviv jsou od sebe odlišena číselným značením. Fluorescenční sondy tohoto typu se využívají pro jejich vlastnost vykazovat spektrální odezvy po navázání vápenatých iontů při použití fluorescenční mikroskopie a fluorescenční spektroskopie.[14, 15]

Barviva Fluo-8 byla vyvinuta pro snadnější obarvení buňky a lepší vápníkovou odezvu. Tento druh barviva má stejnou vlnovou délku maximální excitace, jako jeho předchůdci. Další výhodou tohoto barviva oproti jeho předchůdcům je, že při jeho použití není vyžadována teplota 37 °C, ale stačí pokojová teplota. Fluo-8 je navíc je dvakrát jasnější než Fluo-4 AM a dokonce čtyřikrát jasnější než Fluo-3 AM. Jeho fluorescence se výrazně zvýší po navázání na vápník. Dále dochází ke zvýšení fluorescence, pokud dojde se zvýší intracelulární hladina vápníku.[14, 15]

Barvivo Fluo-8 se do buňky dostává před buněčnou membránu. Jakmile se barvivo dostane do buňky jsou jeho lipofilní blokuující skupiny štěpeny pomocí anestetika, což vyvolá, že fluorescenční barvivo, které zůstává uvnitř buňky je negativně nabitě.[14, 15]



Obr. 2.5: Chemická struktura barviva Fluo-8. [14]

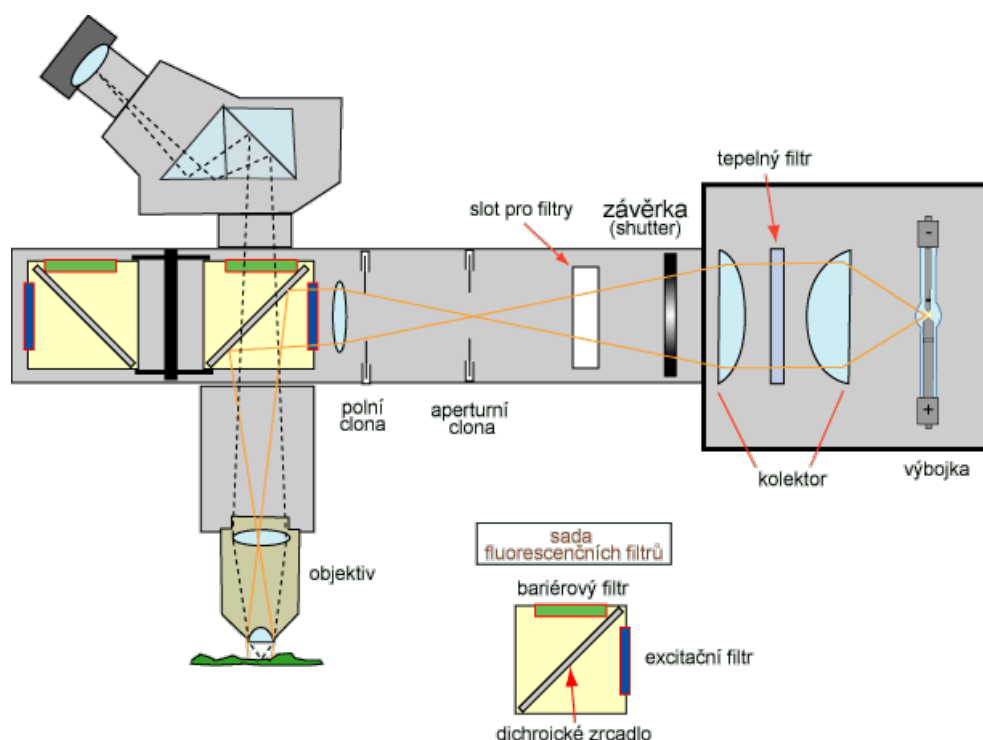
2.3 Konstrukce fluorescenčního mikroskopu

Mikroskop je přístroj, který se skládá ze tří částí – světelné, optické a mechanické. Fluorescenční mikroskop se od optického liší specifickými díly.

Obvykle používaným zdrojem světla fluorescenčního mikroskopu jsou vysokotlaké výbojky. Intenzivní bodový zdroj světla vzniká obloukovým výbojem mezi elektrodami. V praxi se používají rtuťové, nebo xenonové výbojky. Rtuťové výbojky jsou skleněné vysokotlaké trubice, které mají dvě elektrody a jsou vyplněné parami rtuti. Po dosažení dostatečně vysokého napětí (asi 600V) dochází díky ionizaci par k obloukovému výboji. Na podobném principu fungují i výbojky xenonové. Hlavní rozdíl mezi výbojkami je v napájení a emitovaných spektrech záření. Střídavým proudem napájíme výbojky rtuťové, zatímco xenonové výbojky napájíme usměrněným zdrojem s vyšším napětím. Emitované spektrum Xenonové výbojky má homogennější rozložení, nemá výrazné píky.[7]

Výbojky se v mikroskopu umísťují do lampové skříně. Ta by v případě exploze výbojky měla zabránit vzniku úrazu. Exploze výbojky může být způsobena kvůli vysokému vnitřnímu tlaku a vysokým teplotám. Dalším důvodem k umístění výbojky do lampové skříně je eliminace úniku záření výbojky mimo prostředí osvětlovače mikroskopu. Únik krátkovlnného UV záření vytvořeného výbojkou by mohl vážně poškodit zrak. Každá výbojka má omezenou svoji životnost. Po uplynutí této doby může být stále funkční, ale dochází k poklesu světelné intenzity a k zvýšení rizika exploze.[7]

Kolektor osvětlovače zajišťuje přenos světla z oblouku výbojky do skupiny fluorescenčních filtrů odtud světlo pokračuje do objektivu. Součástí kolektoru je tepelný



Obr. 2.6: Konstrukce fluorescenčního mikroskopu. [7]

filtr, který odfiltruje dlouhovlnné záření (vlnovou délku delší než 800nm), aby nedocházelo k zbytečnému zahřívání pozorovaného objektu.[7]

Otevřením a uzavřením závěrky umožňuje mikroskop regulaci pocházejícího světla osvětlovačem, excitační dobu objektu, a tím je také omezen průchod krátkovlnného záření do okolí. Neutral density filtry nám pomáhají regulovat intenzitu záření pro excitaci. Tyto filtry se vkládají do slotu v osvětlovači.[7]

Nastavením polní a aperturní clony můžeme ovlivnit chod paprsků. Funkce aperturní clony je spojená se vznikem fluorescence. Zdroje fluorescence se považují za samostatné zdroje záření.[7]

Sada fluorescenčních filtrů zajišťuje oddělení excitačního a emisního spektra záření. Filtry jsou uspořádány do bloku spolu s dichroickým zrcadlem. Tento blok bývá často nazýván filtrblok nebo fluorescenční kostka. Část spektra, která je určena pro excitaci fluorochromu vymezuje excitační filtr. Emisní filtr naopak vymezuje část spektra emitovanou fluorochromem. Emisní filtr může určovat spodní hranici propuštěných vlnových délek, nebo ohraničuje spektrum z obou stran. Další částí fluorescenční kostky je dichroické zrcadlo. To je v bloku umístěné pod úhlem 45° . Zrcadlo je tenké a vyrobeno ze skla, je schopno odrazit světlo daných vlnových délek a také propouštět světlo jiných vlnových délek. Díky tomu můžeme s poměrně vysokou efektivitou odrážet excitační a propouštět emisní záření.[7]

2.4 Výhody a nevýhody

Výhodou fluorescenčního mikroskopu je schopnost pozorovat konkrétní část vzorku jako je buněčné jádro, membrána atd.. Mezi další výhody patří vysoká citlivost mikroskopu a selektivita, které je dosaženo zejména pomocí fluorescenčních barviv. Díky vysoké selektivitě mají snímky z fluorescenčního mikroskopu také vysoký kontrast.

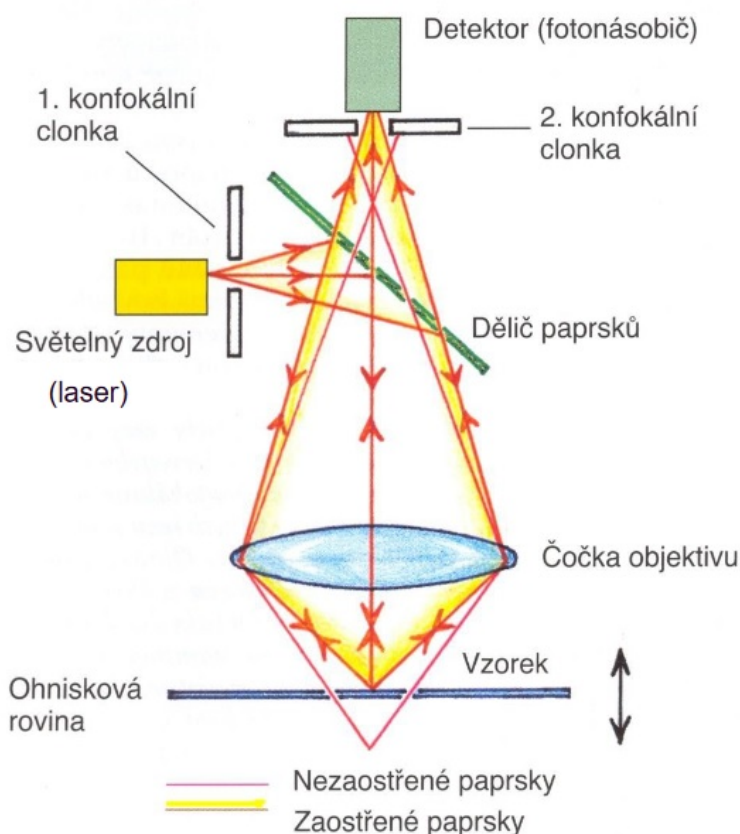
Nevýhodou fluorescenčních mikroskopů může být rozmazaný obraz, který vzniká v důsledku toho, že vzorek je excitován celý, a ne pouze jeho zaostřená rovina. Světlo z částí vzorku, které jsou pod a nad zaostřenou rovinou způsobuje rozmazání obrazu na zaostřené rovině. Parazitní jas může také vznikat kvůli schopnosti autofluorescence některých látek. Další nevýhodou je jev nazývaný fotovybělování. Při fotovybělování dochází k trvalé ztrátě fluorescenčních barviv emitovat záření. Ke ztrátě této schopnosti dochází v důsledku intenzivního ozáření fluoroforu, které má za důsledek nevratné strukturní změny. Fluorofor se také nemusí navázat správně, proto může vzniknout problém u kvantitativního měření. Větší zastoupení sledovaného objektu nemusí souviset s vyšším jasnem.[7]

3 Konfokální mikroskop

Díky vzniku konfokální mikroskopie došlo ke zlepšení např. rozlišení obrazu a vzniku trojrozměrných snímků. První koncept konfokální mikroskopie představil v roce 1961 Marvin Lee Minsky. Minskyho koncept byl čistě teoretický, protože v této době chyběli potřebné technologie. Jedním z hlavních problémů byl chybějící software, který by byl schopný sestavit obraz. Dalším problémem bylo sehnání zdroje světla, které by bylo dostatečné.

3.1 Princip

Konfokální mikroskop se skládá ze zdroje světla, konfokálních clon, dichromatického zrcadla, objektivu, bariérový filtr a fotonásobiče.



Obr. 3.1: Schéma konfokálního mikroskopu. [16]

Úzký svazek intenzivního bodového zdroje světla, který může být získán pomocí laseru, prochází první konfokální clonou na dichromatické zrcadlo. Zrcadlo pomocí objektivu zaměří paprsek světla na nějaký bod preparátu. Průměr preparátu musí odpovídat rozlišovací mezi. Preparát je pomocí počítače, nebo skenovacího zařízení

umístěn do ohniskové roviny. Světlo odražené od vzorku projde objektivem dále projde dichroickým zrcadlem, bariérovým filtrem, druhou konfokální clonou a nakonec fotonásobičem. Druhá clona je zde přítomna, aby vyfiltrovala světlo, které pochází z jiné než ohniskové roviny. Fotonásobič konverzuje vstupující fotony na elektrony, dále je znásobí a následně je signál detekován díky procházejícímu proudu. Informace o preparátu jsou dále předány a uloženy. Mezi tyto informace patří také souřadnice daného bodu, které jsou následně použity pro sestavení celkového obrazu.[16]

Základní vlastnosti laserově řádkovací konfokální mikroskopie je, že netvoří obraz najednou, nýbrž řádkováním bod za bodem. Kvůli tomu jsou snímány jednotlivé body o daných souřadnicích postupně. Díky pevně definovanému posunu na ose lze snímat i jednotlivé optické řezy. Pro získání obrazu bod za bodem lze použít více technik. První z těchto technik je rozmítání laserového paprsku, další technikou je postupný posuv vzorku před statickým objektivem a v neposlední řadě lze pro získání obrazu posouvat objektivem.[16]

Laserový řádkovací konfokální mikroskop používá laserový paprsek jako zdroj světla. Tento paprsek je zaměřen pomocí systému clonek na preparát. Následně dochází k postupnému skenování preparátu bod za bodem. Postupné skenování lze provést tak, že máme statický zdroj světla a pohybujeme preparátem, nebo se naopak pohybuje zdroj světla a preparát je statický. Tento mikroskop je užitečný pro snímání preparátů.[16]

Dalším principem skenování preparátu je použití rotujícího disku, který je známý pod názvem Nipkowův kotouč. Rotující disk je perforovaná destička, která rychle rotuje. Přes tuto destičku je světlo zaměřeno na preparát díky vzájemně odděleným clonkám, které jsou na kotoučku přítomny. Výhodou tohoto principu skenování je možnost zobrazení několika preparátů najednou. Tato výhoda je daná díky rychlému snímání a nižší intenzitě světla, které na vzorek dopadá. Tato metoda se používá pro pozorování dějů v živých buňkách.[16]

3.2 Laserový rastrovací konfokální mikroskop LEICA TCS SP8

Mikroskop Leica TCS SP8 je navržen pro konfokální mikroskopii, která má optimální účinnosti fotonů a vysokou rychlost. Všechny optické komponenty jsou upraveny tak, aby přispívaly k dobrému dynamickému kontrastu, zachování fluorescence a ke zlepšení snímání buněk v živých kulturách. Mikroskop je schopný snímat až 428 snímků za sekundu, což je důležité pro citlivou detekci. Velikost zorného pole závislá na použitém objektivu. Díky těmto parametrům a režimu Galvoflow je mikroskop vhodný pro náročnější aplikace, které vyžadují vyšší rychlost.[17]

Skenovací hlava obsahuje skenovací optiku CS2, která se vyznačuje vysokou propustností. Díky designu skenovací hlavy dochází k vyšší citlivosti a optimálnímu průchodu světelného paprsku. Akustický optický dělič svazků umožňuje navázání až osmi vlnových délek bez nutnosti využití dichroických zrcadel. Optický hranol umožňuje získat signál a libovolně ho rozdělit na části spektra pro detekci. Díky tomu systém disponuje spektrální detekcí bez snížené propustnosti.[17]

Konfokální mikroskop je vybaven FOV (*Field Of View*) a Tandemovým skenerem. FOV skener umožňuje zobrazení preparátu v jednom záběru. Pro vysokorychlostní experimenty s proteiny se využívá Tandemového skeneru. Jako monochromatický zdroj světla využívaný pro spektrální separaci je použit plynový laser. Dále mikroskop obsahuje tuhý laser a bílý laser, který umožňuje komplexní spektroskopické zobrazení.[17]

Díky využití vysoce výkonné optiky, vysoce citlivého detekčního systému a rychlého konfokálního skeneru patří mikroskop Leica TCS SP8 mezi jeden z nejlepších mikroskopů na trhu. Široké spektrum příslušenství a upgradů je mikroskop velice flexibilní a vhodný pro širokou škálu experimentů.[17]

3.3 Výhody a nevýhody

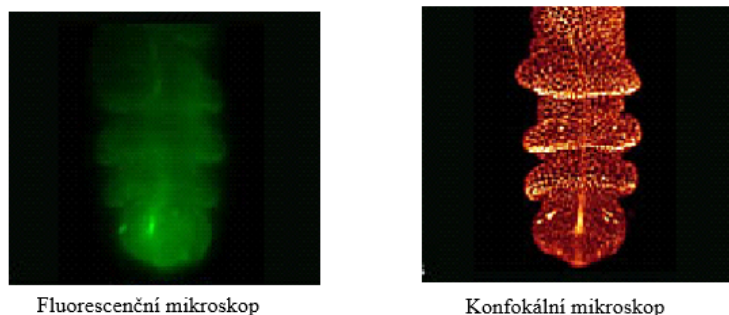
Mezi výhody konfokálního mikroskopu patří potlačení mlhavého pozadí v obrazu. Další užitečnou vlastností je možnost proniknout hlouběji do vzorku. Optická tomografie není limitována Rayleighovým kritériem. Obraz je tvořen jednotlivými body Airyho kroužků. Další výhodou konfokálního mikroskopu je možnost zaznamenávání série digitalizovaných řezů v rámci vzorku. Tyto řezy pak dále mohou být použity pro sestavení trojrozměrného obrazu.[18]

Největší nevýhodou konfokálního mikroskopu je zatížení statistickým šumem, jehož velikost se odvozuje z počtu detekovaných fotonů. Dalším problémem je ne snadné řešení zvýšení intenzity záření. Další nevýhodou jsou technické nároky na provoz mikroskopu.[18]

3.4 Rozdíly mezi konfokálním a fluorescenčním mikroskopem

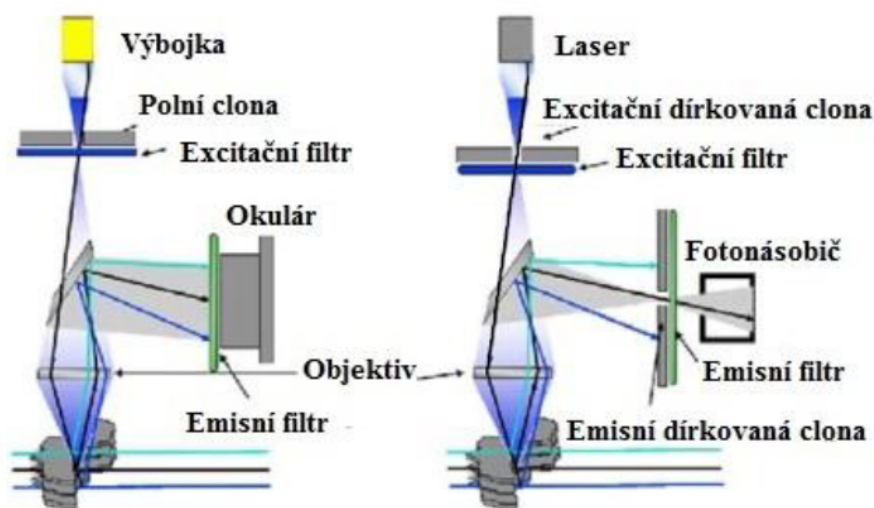
Konfokální mikroskop nám umožňuje získat vyšší rozlišovací schopnost, která je daná díky detekci světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Přítomnost pinhole eliminuje neostrý signál jak horizontálně, tak vertikálně a tím zajišťuje minimální hloubku ostrosti. Zatímco při použití fluorescenčního mikroskopu lze pozorovat pouze vzorky

o menší tloušťce, než je hloubka ostrosti objektivu, která závisí na numerické apertuře objektivu. Při zkoumání silných vzorků fluorescenčním mikroskopem je kvalita zobrazovaného vzorku nepříznivě ovlivněna překrýváním obrazu roviny, na niž je mikroskop zaostřen. Zaostřená rovina je zkreslena neostrými obrazy rovin, které leží nad a pod ní.[18, 6]



Obr. 3.2: Snímek z fluorescenčního a konfokálního mikroskopu. [16]

Mezi další rozdíl patří zdroj světla mikroskopu. Zatímco fluorescenční mikroskop využívá jako zdroj světla rtuťovou výbojku, konfokální mikroskop vyžaduje mimořádně silný zdroj světla např. ve formě laseru, nebo speciální technologie, která dokáže detekovat fotony z horizontální roviny. Nevýhodou fluorescenčního mikroskopu je zatížení statickým šumem, jehož odstranění nelze řešit zvýšením intenzity záření.[18]



Obr. 3.3: Fluorescenční a konfokální mikroskop. [18]

Možnost 3D rekonstrukce obrazu, která není limitována Rayleighovým kritériem je jednou z vlastností konfokálního mikroskopu. Obraz vzniká seskládáním jednotlivých bodů, které jsou pozorovány přes clonu. U fluorescenčního mikroskopu není obrazem bodu bod, ale Airyho kroužky, což jsou difrakční obrazce vznikající ohybem zobrazujícího se světla na čočkách objektivu. Airyho kroužky se mohou překrývat, pokud zobrazujeme blízké body. V některých případech se mohou stát téměř nerozlišitelnými.[18]

Cena konfokálního mikroskopu je 5-10x vyšší než cena mikroskopu fluorescenčního. Což je dáno zejména díky zdroji světla mikroskopu.[18]

4 Příprava buněk pro snímání tubulárního systému kardiomyocytů

Před samotným snímáním tubulárního systému kardiomyocytů je potřeba si buňky správně připravit. Příprava kardiomyocytů začíná jejich izolací ze srdce laboratorního zvířete. V našem případě jsme pracovali s prasečími kardiomyocyty a kardiomyocyty získanými ze srdce laboratorního potkana.

Poté co jsou buňky izolovány proběhne jejich barvení. Pro naše potřeby jsme použili kombinaci dvou fluorescenčních barviv. Jedno z barviv nabarvilo intracelulární prostor buňky a druhé barvivo jsme použili pro obarvení buněčné membrány a tubulárního systému kardiomyocytu.

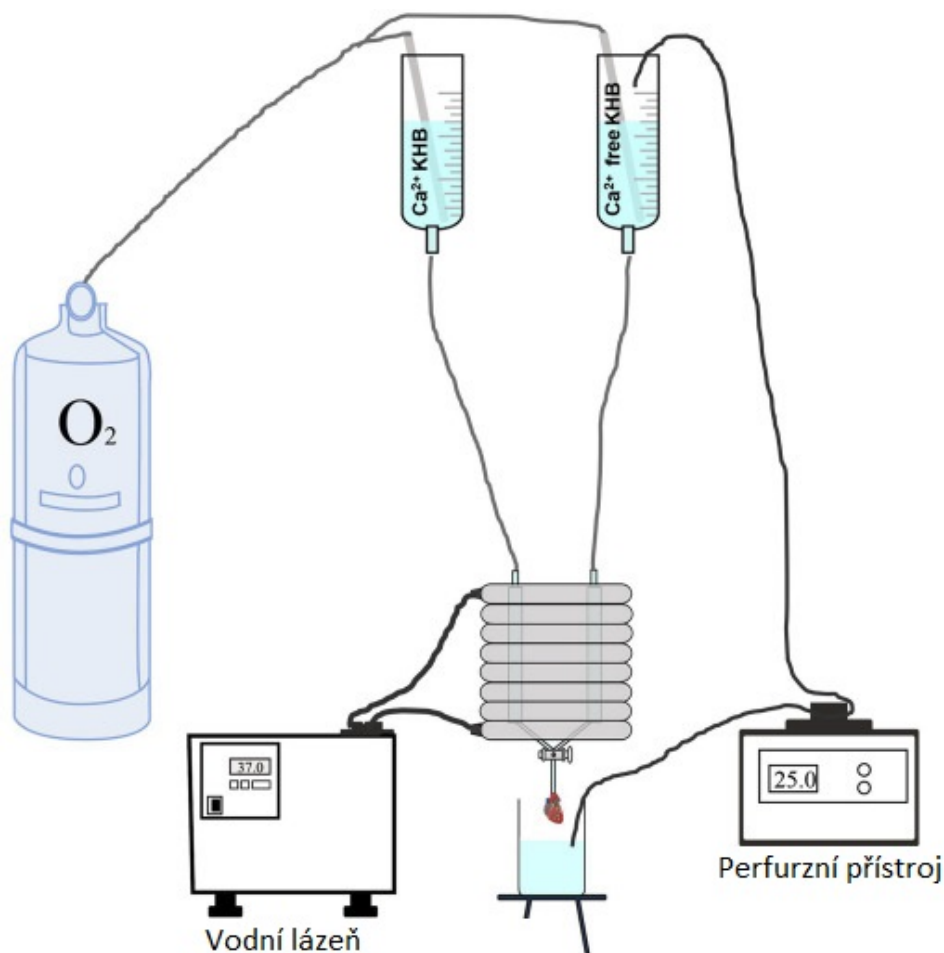
4.1 Izolace kardiomyocytů

Srdeční buňky byly izolovány na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity. Pro získání buněk byla použita metoda enzymatické disociace. Celý proces izolace se provádí při teplotě 37°C.

Proces izolace buněk začne usmáním zvířete pomocí anestezie. Správné uspání zvířete se kontroluje bolestivým podmětem, nejčastěji stačením přední končetiny. Pokud zvíře na podmět reaguje dostane další dávku anestezie. Když je zvíře správně uspané je mu rozstřížena kůže a přední část hrudního koše, aby byl umožněn přístup k srdci. V této fázi se musí postupovat rychle, protože srdce podléhá ischemii. Aorta a ostatní cévy rozvádějící krev ze srdce, nebo zpátky do něj jsou od srdce odstříženy. Další část musí být provedena rychle, protože nyní srdcem neproudí žádné živiny a kyslík. Ze srdce jsou odstříženy nepotřebné tkáně jako je např. perikard, nebo tuková tkáň. Srdce je pomocí pahýlu aorty zavěšeno na kanylu perfurzního přístroje, kde je pomocí provázku pevně připevněno.[19]

Srdce je postupně proplachováno roztoky pomocí perfurzního přístroje. Každý roztok je před použitím dostatečně okysličen a pomocí vodní lázně zahřát na teplotu 37°C. Nejprve je srdce retrogradně prokrvováno roztokem Tyrode, který obsahuje 0,9mM CaCl_2 , po dobu 3-5 minut. Následuje proplachování srdce roztokem *Ca-free* Tyrode po dobu 4 minut. Po dvou minutách proplachování srdce *Ca-free* Tyrode roztokem je do srdce přiváděn *Ca-free* Tyrode roztok, který obsahuje kolagenázu o koncentraci 0,2mg/ml, proteázu o koncentraci 0,056mg/ml, BSA (roztok používaný jako pufruční činidlo krve a také se používá jako živný roztok pro buněčné kultury) o koncentraci 2mg/ml a EGTA (roztok snižující reaktivitu některých iontů např. Ca^{+2}) o koncentraci 44 $\mu\text{g/l}$. V dalším kroku je srdce proplachováno roztokem

Tyrodu CaCl_2 o nižší hladině vápenatých iontů zhruba 20 minut. Díky tomu se ze srdce postupně vymyjí proteázy a albumin.[19]



Obr. 4.1: Schéma perfuzního systému pro izolaci kardiomyocytů [20]

Následně je srdce rozděleno na jednotlivé části. Ty jsou vloženy do roztoku Tyrodu CaCl_2 o koncentraci 0,18mmol/l, kde jsou rozmělněny. Následně je roztok Tyroly s rozmělněnými srdečními buňkami filtrován, aby došlo k odstranění zbytků tkáně.[19]

Důležitým faktorem pro správnou izolaci buněk je odhadnutí doby působení enzymů, které rozvolňují konexony a tak uvolňují jednotlivé buňky. Pokud budou enzymy působit delší dobu, než by měly může dojít i k natrávení samotných buněk. V opačném případě nebude srdce natráveno dostatečně a izolaci získáme pouze malý počet buněk.[21]

V získané suspenzi máme živé a nepoškozené kardiomyocyty, které jsme schopni použít pro následující pokusy, ale také buňky poškozené, nebo mrtvé.

Roztok Tyroly je téměř izotonický roztok s intersticiální tekutinou používá se především při fyziologických experimentech a při kultivaci tkáňových kultur. Ob-

vykle se skládá z 135mM NaCl, 4mM KCl, 1,8mM CaCl₂, 1,2mM MgCl₂, 10mM HEPES a 10mM glukózy. Jeho pH je 7,4 při pokojové teplotě. Existují také varianty Tyrodu, které obsahují fosfáty, sírany, nebo draselné soli. Roztok Tyrodu je možné podle potřeby případně upravit, a to díky změně koncentrace látek. Další hojně používaným médiem je Kerbs-Henseleit roztok, který je často používán jako alternativa Tyrodova roztoku.[19]

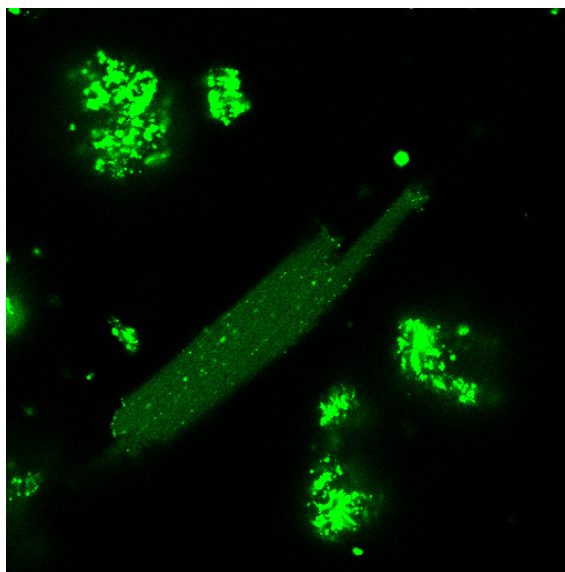


Obr. 4.2: Čerstvě izolované kardiomyocyty [21]

4.2 Barvení kardiomyocytů pomocí Fluo-8

Fluorescenční barvivo Fluo-8 (5-chlormethylfluorescein) bylo vybráno na základě práce E. Aguettaze a kolektivu[22]. Toto barvivo je určeno zejména pro monitorování vápníku v buňkách. Stejně jako barvivo CMFDA má zelené emisní spektrum. Barvivo Fluo-8 jsme používali v kombinaci s barvivem di-4-ANEPPS.[14]

Při barvení buněk jsme postupovali následovně. Do zkumavky napipetujeme 300μl buněk, které jsou rozmíchány v základním roztoku. Dále přidáme 10μl barviva Fluo-8, 0,4μl pluronicu a necháme 20 minut inkubovat. Poté dáme zkumavku s buňkami na 30 sekund centrifugovat při 0,8 rpm. Odsajeme co nejvíce kapaliny a poté buňky obarvíme barvivem di-4-ANEPPS.[14] [15]

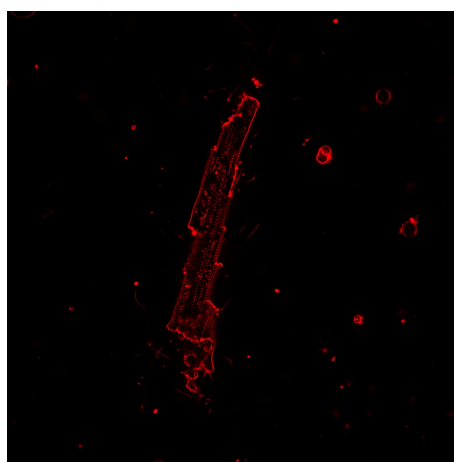


Obr. 4.3: Kardiomyocyt obarvený barvivem Fluo-8.

4.3 Barvení kardiomyocytů pomocí di-4-ANEPPS

Barvivo di-4-ANEPPS bylo vybráno po dohodě s vedoucí bakalářské práce a na základě práce Katharine M. Dibb a kolektivu [4]. Barviva ANEP se používají při detekci malých změn v rámci membránového napětí. Při použití barviva di-4-ANEPPS dosáhneme dostatečně rychlé barevné odezvy, proto je vhodné pro měření živých buněk.[10]

Při barvení buněk v kombinaci s barvivem CMFDA postupujeme následovně. Do zkumavky napipetujeme 200 μl buněk, které jsou rozmíchané v základním roztoku, dále přidáme 0,25 μl di-4-ANEPPS, 0,1 μl pluronicu a 0,2 μl COCl_2 . Tuto směs promícháme a část napipetujeme do konfokální misky.



Obr. 4.4: Kardiomyocyt obarvený barvivem di-4-ANEPPS.

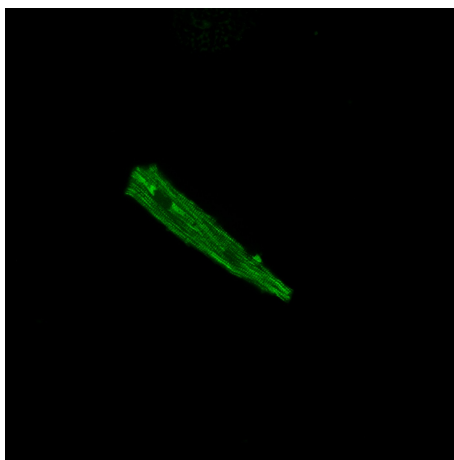
Pokud barvivo di-4-ANEPPS kombinujeme s barvivem Fluo-8 postup je následovný. Buňky jsou nejprve obarveny pomocí barviva Fluo-8, poté do zkumavky napipetujeme 300 μ l základního roztoku, 0,75 μ l barviva di-4-ANEPPS, a nakonec do zkumavky napipetujeme 0,3 μ l pluronicu.

4.4 Barvení kardiomyocytů pomocí CMFDA

Fluorescenční barvivo CMFDA (5-chlormethylfluorescein) bylo vybráno na základě práce A. Andrzejewské a kolektivu [22]. Andrzejewská a spol. Toto barvivo se hojně používá při sledování pohybu buněk. Jeho zelené emisní spektrum je vhodné pro kombinování s červenými fluorescenčními barvivy.[13]

Díky jeho malé permeabilitě před buněčnou membránu zůstává delší dobu uvnitř buňky. Výhodou tohoto barviva je stabilita a nízká toxicita. Barvivo CMFDA jsme používali v kombinaci s barvivem di-4-ANEPPS.[13]

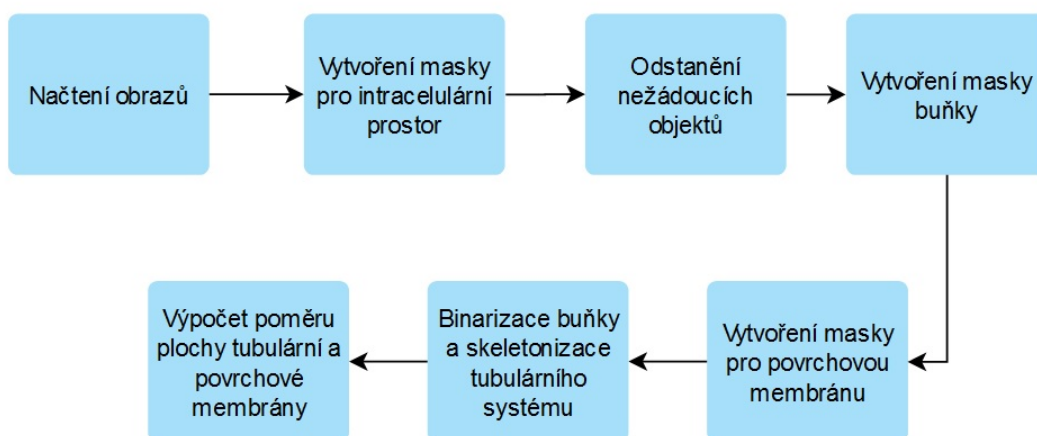
Při barvení buněk postupujeme následovně. Do zkumavky napipetujeme 1ml buněk, které jsou rozmíchané v základním roztoku. Dále přidáme 0,5 μ l barviva CMFDA a necháme 5 minut inkubovat. Poté necháme zkumavku s buňkami 4 minuty centrifugovat při 0,8 rpm. Poté do zkumavky napipetujeme další 1ml buněk. Posledním krokem je napipetování zhruba 200 μ l do kontaktní misky.



Obr. 4.5: Kardiomyocyt obarvený barvivem CMFDA.

5 Program pro analýzu snímků

Za účelem analýzy získaných obrazů byl navržen algoritmus v programovém prostředí MATLAB (verze R2018b). Cílem algoritmu je efektivní odstranění rušivých elementů, jako jsou okolní mrtvé buňky, zatímco zachová informace o analyzované buňce, pro následné stanovení poměru plochy tubulární a povrchové membrány.



Obr. 5.1: Postup při zpracování nasnímaných obrazů.

Prvním krokem je načtení odpovídajících si snímků z konfokálního mikroskopu a následné převedení na šedotónový obraz. Pokud jsou nežádoucí objekty u obou mikroskopických snímků podobné dojde k přizpůsobení histogramu snímku, na kterém je kardiomyocyt obarven barvivem CMFDA, nebo barvivem Fluo-8. K přizpůsobení histogramu dochází díky referenčnímu obrázku. Díky přizpůsobení histogramu jsme schopni odstranit nežádoucí objekty ze snímku, kde je buňka obarvena CMFDA barvivem, nebo barvivem Fluo-8.

Následuje manuální vybrání oblasti zájmu. Pro výběr oblasti zájmu jsou použity oba snímky, které jsou složené do jednoho. Oblast zájmu se pokoušíme vybrat tak, aby okolí kardiomyocytu bylo co nejmenší, a přitom obsahovala celou buňku, pokud je potřeba můžeme oblast zájmu natočit. Poté je z šedotónových snímků vybrána zvolená oblast zájmu. V případě potřeby dochází k rotaci snímků, tak aby byla dolní hranice oblasti zájmu paralelně s podélnou osou.

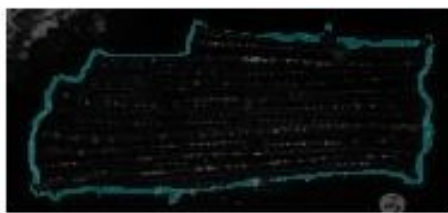
Dalším krokem je vytvoření masky intracelulárního prostoru kardiomyocitu, ke kterému dochází na vybrané oblasti zájmu mikroskopického snímku s barvivem CMFDA nebo Fluo-8. Před dalším zpracováním na snímek aplikujeme vyhlazovací filtr. Pro získání masky začneme detekcí hran pokračujeme jejich rozšířením. V takhle vzniklé masce vyplníme mezery a ze snímku odstraníme objekty, které mají malý

počet pixelů. Posledním krokem při vytváření masky je vyhlazení jejich hran a opakované odstranění objektů s malým počtem pixelů, které mohou být následkem vyhlazení. Výsledkem je binární maska snímku.



Obr. 5.2: Maska intracelulárního prostoru.

Pro odstranění nežádoucích objektů z mikroskopických snímků s barvivem di-4-ANEPS je použita maska intracelulárního prostoru kardiomyocytu. Tato maska je zvětšena, tak aby přesahovala celý kardiomyocyt. Tuto zvětšenou masku aplikujeme na snímek s barvivem typu ANEP a všechny hodnoty pixelů mimo masku nastavíme na nízkou hodnotu a tím odstraníme většinu nežádoucích objektů. Při vytváření masky pro celou buňku začneme adaptací jasu a následnou vyhlazovací filtrací snímku s barvivem typu ANEP bez nežádoucích objektů. Následující postup je stejný jako postu pro vytváření masky intracelulárního prostoru. Začínáme detekcí hran následuje jejich rozšířením a vyplnění masky. Následuje odstranění malých objektů vyhlazení masky a opětovné odstranění objektů s malým počtem pixelů. Na konci tohoto postupu získáme binární masku pro kardiomyocyt. Masku pro povrchovou membránu vytvoříme odečtením masky intracelulárního prostoru od masky pro buňku kardiomyocytu.



Obr. 5.3: Maska povrchové membrány.

Binární masku kardiomyocytu použijeme pro odstranění nežádoucích objektů ze snímku s barvivem di-4-ANEP, tak že všechny hodnoty pixelů mimo masku nastavíme na nulu. Poté takto upravení snímek pomocí vhodného prahu převedeme do binární podoby. Ze získaného binárního obrázku kardiomyocytu si pomocí masek extrahujeme povrchovou membránu a tubulární systém kardiomyocytu. Před zahájením výpočtů je nutné provést skeletanizaci tubulárního systému.

Plochu buňky stanovíme pomocí vytvořené masky, jako součet všech pixelů, které tuto masku tvoří. Plochu povrchové membrány stanovíme sečtením všech pixelů binárního obrázku kardiomyocytu, které jsou v oblasti masky pro membránu. Plochu tubulární membrány stanovíme sečtením všech pixelů skeletonizovaného binárního obrázku tubulárního systému, které jsou v oblasti masky pro intracelulární prostor kardiomyocytu. Ze získaných hodnot následně vypočteme poměr plochy tubulární a povrchové membrány.

6 Hodnocení výsledků a diskuze

Vzhledem k tomu, že izolace kardiomyocytů na Lékařské fakultě Masarykovi univerzity probíhala pouze omezeně, byly provedeny experimenty se snímáním kardiomyocytů pouze dvakrát. Životnost buněk není neomezená. Už v průběhu izolace dochází k umírání kardiomyocytů. Stejně je tomu i při přepravě buněk, kde dochází k postupnému zhoršení fyziologických podmínek a následnému úmrtí. Proto je důležité, aby experimenty proběhli co nejdříve po izolaci kardiomyocytů.

Při prvním experimentu byly použity kardiomyocyty z prasečího srdce a při druhém experimentu jsme snímali kardiomyocyty ze srdce laboratorního potkana. Před samotným snímáním tubulárního systému bylo potřeba buňky nabarvit vybranými barvivy. Postup při barvení kardiomyocytů jednotlivými barvivy byl několikrát upraven, abychom dosáhly co nejlepších výsledků. Kvalita nabarvení jednotlivých buněk byla určena snímáním pomocí konfokálního mikroskopu a vyhodnocením fluorescence nabarvených buněk.

Při prvním experimentu jsme buňky barvili pomocí fluorescenčních barviv di-4-ANEPPS a CMFDA. Při prvním nabarvení pomocí barviva di-4-ANEPPS jsme po smíchání všech komponentů počkali pět minut a potom jsme připravená buňky pětkrát naředili základním roztokem. Po prvním barvení buněk fluorescenčním barvivem di-4-ANEPPS jsme upravili množství použitého barviva, pluronicu a COCl₂. Množství těchto látek jsme snížili na polovinu, zatímco množství buněk rozmíchané v základním roztoku jsme ponechali stejné. Postup pro barvení fluorescenčním barvivem CMFDA nebylo nutné upravovat.

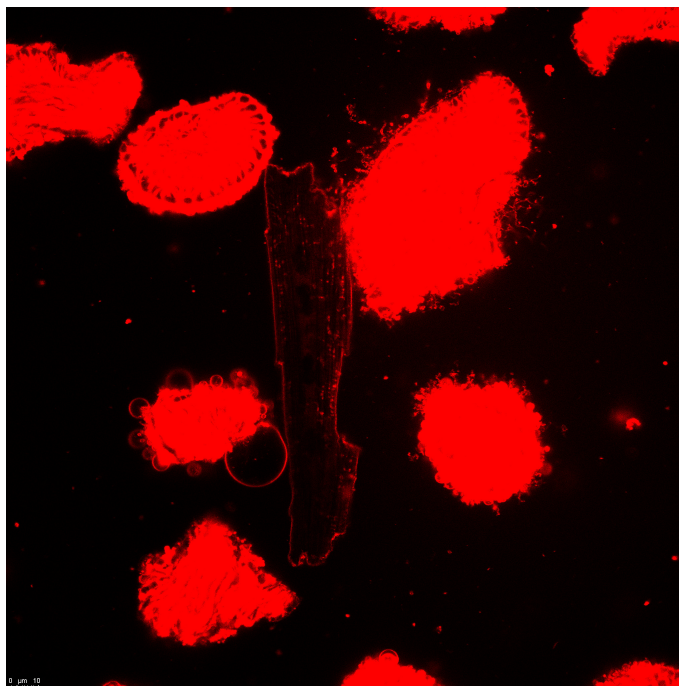
Při druhém experimentu byly buňky barveny pomocí fluorescenčních barviv Fluo-8 a di-4-ANEPPS. Jelikož jsme fluorescenční barvivo di-4-ANEPPS použili již při prvním experimentu postup pro barvení buněk zůstal stejný a množství jednotlivých použitých látek pro barvení jsme přizpůsobili použitému množství buněk rozmíchaných v základním roztoku. Při barvení buněk pomocí fluorescenčního barviva Fluo-8 jsme postupně zvyšovali množství tohoto barviva, dokud jsme nedosáhli uspokojivých výsledků.

Po dosažení uspokojujících výsledků při barvení buněk jednotlivými barvivy jsme mohli pokračovat. Následujícím krokem bylo obarvení kardiomyocytů dvěma fluorescenčními barvivy zároveň. Z nichž jedno bylo použito pro obarvení intracelulárního prostoru buňky a druhé pro obarvení povrchové membrány a tubulárního systému kardiomyocytu.

Jelikož ustanovení postupu a samostatné barvení kardiomyocytů fluorescenčními barvivy bylo časově náročné, podařilo se nám získat pouze pár nabarvených buněk, které byly vhodné pro použití při segmentaci navrženým algoritmem. V některých případech i když byla buňka nabarvená správně nedala se použít pro segmentaci,

protože se její povrchová membrána se dotýkala nabarvené mrtvé buňky.

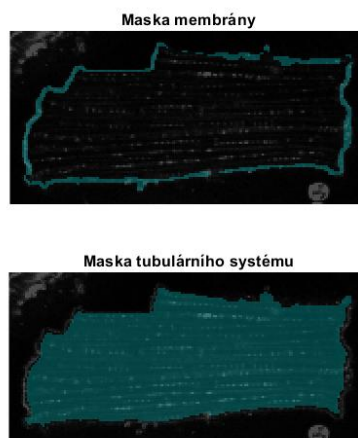
Dalším důvodem, proč některé snímky nemohli být použity, je přítomnost vzduchových bublin u povrchové membrány kardiomyocytu. Tyto vzduchové bubliny nám zabraňují správné detekci jednotlivých hran nabarvené buňky, a proto nemohou být použity při segmentaci navrženou metodou.



Obr. 6.1: Snímek nevhodný pro další zpracování.

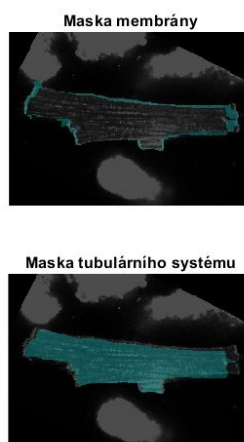
Pro segmentaci membrány a tubulárního systému kardiomyocytů byl vytvořen algoritmus v programovém prostředí MATLAB (verze R2018b). Algoritmus byl použit pro segmentaci a následný výpočet poměru plochy povrchové a tubulární membrány nabarvených kardiomyocytů. Jak už bylo zmíněno kvůli časové náročnosti experimentů a omezené izolaci kardiomyocytů byl algoritmus spuštěn pouze na dvou snímcích kardiomyocytů. Navržený algoritmus vytvoří masku intracelulárního prostoru následně vytvoří masku buňky a pomocí těchto dvou masek algoritmus vytvoří masku pro povrchovou membránu. Pomocí vytvořených masek je určená celková plocha buňky, membrány a intracelulárního prostoru a z těchto hodnot je následně vypočítán poměr plochy tubulární a povrchové membrány.

Buňky zachycené na vybraných snímcích mají různý tvar, velikost a jsou na snímku jinak prostorově orientované. Na snímcích s názvem cm1 a cm2 jsou zachyceny kardiomyocyty izolované z prasečího srdce. Na snímku s názvem cm1 je kardiomyocyt obarven pomocí fluorescenčního barviva di-4-ANEPPS. Snímek s názvem cm2 zobrazuje kardiomyocyt obarvený fluorescenčním barvivem Fluo-8.



Obr. 6.2: Segmentace membrány a tubulárního systému s daty cm1 a cm2.

Zatímco na snímcích s názvem cm3 a cm4 jsou zachyceny kardiomyocyty izolované ze srdce laboratorního potkana. Na snímku s názvem cm3 je kardiomyocyt obarven pomocí fluorescenčního barviva di-4-ANEPPS. Snímek s názvem cm4 zobrazuje kardiomyocyt obarvený fluorescenčním barvivem CMFDA.



Obr. 6.3: Segmentace membrány a tubulárního systému s daty cm3 a cm4.

Výsledné hodnoty pro poměr plochy povrchové membrány a tubulární membrány jsou uvedeny v procentech a najdeme je v tabulce níže (Tab. 6.1). Z výsledných hodnot je zřejmé, že poměr plochy tubulární membrány je menší než poměr plochy povrchové membrány. Jednotlivé hodnoty pro poměry ploch se od sebe liší. Rozdíl těchto hodnot je v důsledku toho, že jsme pro výpočet těchto hodnot použili buňky z rozdílných živočichů, které byly nabarveny rozdílnou dvojicí fluorescenč-

ních barviv. Architektura tubulárního systému kardiomyocytů se liší v závislosti na živočišném druhu. Podobně je tomu i povrchové membrány. Membrány jednotlivých buněk kardiomyocytů se navíc liší v rámci jednotlivých oblastí srdce.

Název obrázku č.1	Název obrázku č.2	Poměr plochy tubulární membrány (v procentech)	Poměr plochy povrchové membrány (v procentech)
cm1	cm2	8,59	12,65
cm3	cm4	9,92	15,33

Tab. 6.1: Údaje z dat získané pomocí navrženého algoritmu

Závěr

Začátek práce se zaměřuje na popis struktury, funkce a životního cyklu tubulárního systému kardiomyocytů. Následuje kapitola o fluorescenční mikroskopii, kde je popsán nejen principiálně využívaný pro funkci fluorescenčního mikroskopu, ale také konstrukce fluorescenčního mikroskopu. Tato kapitola také obsahuje literární rešerši o použitých fluorescenčních barvivech.

Dále se vyskytuje kapitola o konfokální mikroskopii a porovnání fluorescenční a konfokální mikroskopie mezi sebou. Po nastudování těchto dvou mikroskopických technik jsme se rozhodli pro využití konfokálního mikroskopu k praktickému snímání. Proto je v této části také popsán konfokální mikroskop, který jsme použili pro získání snímků. Další kapitola se zabývá přípravou srdečních buněk pro snímání a postupem, který jsme zvolili pro jejich obarvení.

Program pro analýzu snímků je realizován v programovém prostředí MATLAB (verze R2018b). V programové části je popsána vytvořená metoda pro segmentaci membrány a tubulárního systému. Následně jsou výsledky dosažené touto metodou použity pro výpočet poměru plochy tubulární a povrchové membrány u nasnímaných kardiomyocytů. Před samostatným výpočtem jsou data získaná pomocí konfokálního mikroskopu upraveny, abychom je mohli použít pro následující výpočet. Následuje hodnocení získaných výsledků a jejich diskuze.

Literatura

- [1] HONG, TingTing a Robin M. SHAW. *Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. Physiological Reviews*. 2017, 97(1), 227-252. ISSN 0031-9333.
- [2] *Quantitative Human Physiology*. FEHER, Joseph. : 5.7 - The Cellular Basis of Cardiac Contractility. London: Academic Press, 2012, s. 477-485. ISBN 978-0-12-382163-8.
- [3] Ibrahim, M.; Gorelik, J.; Yacoub, M. H.; Terracciano, C. M.. *The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease". Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 278 (1719): 2714–2723.
- [4] DIBB, Katharine M., Jessica D. CLARKE, Margaux A. HORN, Mark A. RICHARDS, Helen K. GRAHAM, David A. EISNER a Andrew W. TRAFFORD. *Characterization of an Extensive Transverse Tubular Network in Sheep Atrial Myocytes and its Depletion in Heart Failure. Circulation: Heart Failure*. 2009, 2(5), 482-489. ISSN 1941-3289.
- [5] GOLDYS, Ewa M. *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. Hoboken, N.J., c2009. ISBN 978-047-0083-703.
- [6] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902-8961-4.
- [7] *Fluorescenční mikroskopie [online]*. [cit. 26. 11. 2020]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>.
- [8] *LabGuide. Fluofochromy [online]*. [cit. 19. 11. 2020]. Dostupné z: <https://labguide.cz/fluorochromy/>.
- [9] *Fluorescenční mikroskop. Wikipedia: the free encyclopedia [online]*. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2021-5-27]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD_mikroskop
- [10] *Di-4-ANEPPS [online]*. [cit. 23. 12. 2020]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1199#/D1199>
- [11] *Di-8-ANEPPS [online]*. [cit. 22. 3. 2021]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D3167#/D3167>
- [12] Lulevich, V., Shih, Y. P., Lo, S. H., & Liu, G. Y. (2009). *Cell tracing dyes significantly change single cell mechanics. The journal of physical chemistry. B*, 113(18), 6511–6519.

- [13] *CellTracker™ Green CMFDA Dye* [online]. [cit. 23. 12. 2020]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C7025>
- [14] *Abcam: Fluo-8 AM, green fluorescent calcium binding dye (ab142773)*. Abcam [online]. [cit. 23.5.2021]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/fluo-8-am-green-fluorescent-calcium-binding-dye-ab142773.html>
- [15] *AAT Bioquest: Fluo-8®, AM* [online]. [cit. 25. 5. 2021]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/products/fluo-8-am>
- [16] L. Kubínová: *Pohledy do trojrozměrného mikrosvěta: konfokální a dvoufotonová mikroskopie*. Živa 6/2006, 245-248. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/pohledy-do-trojrozmerneho-mikrosveta-konfokalni-a.pdf>
- [17] *Confocal Laser Scanning Microscope Leica TCS SP8*. Leica Microsystems[online].[cit. 2020-12-20]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/leica-tcs-sp8-configurable-confocal/details/product/leica-tcs-sp8/>
- [18] SEHADOVÁ, Hana. *Fluorescenční a konfokální mikroskopie*. Biologické centrum AVČR, České Budějovice [online]. [cit. 20. 12. 2020]. Dostupné z: <http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>
- [19] BERGER, H. J., S. K. PRASAD, A. J. DAVIDOFF, D. PIMENTAL, O. ELLINGSEN, J. D. MARSH, T. W. SMITH and R. A. KELLY, 1994. *Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*
- [20] Tian, X., Gao, M., Li, A., Liu, B., Jiang, W., Qin, Y., & Gong, G. (2020). *Protocol for Isolation of Viable Adult Rat Cardiomyocytes with High Yield*. *STAR protocols*, 1(2), 100045.
- [21] Nippert, F., Schreckenberger, R., & Schlüter, K. D. (2017). *Isolation and Cultivation of Adult Rat Cardiomyocytes*. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (128), 56634.
- [22] Andrzejewska, A., Jablonska, A., Seta, M., Dabrowska, S., Walczak, P., Janowski, M., & Lukomska, B. (2019). *Labeling of human mesenchymal stem cells with different classes of vital stains: robustness and toxicity*. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 187.

Seznam symbolů, veličin a zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
FITC	Fluorescein-5-isothiokyanát
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenyindol
ANEPP	Aminonaphthylethylenpyridinium
CMFDA	5-chlormethylfluorescein diacetát
FOV	Zorné pole z angl. field of view
3D	Trojrozměrný
CaCl₂	Chlorid vápenatý
BSA	Bovine serum albumin
EGTA	Kyselina egtazová
NaCl	Chlorid sodný
KCl	Chlorid draselný
MgCl₂	Chlorid hořečnatý
HEPES	Kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic
CoCl₂	Chlorid kobaltnatý